

УДК 612.127.2

ОЦЕНКА ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Кошечев В.Н., Савченко А.А.

научный руководитель д-р мед. наук Савченко А.А.

НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН

Очень слабое свечение или собственное излучение клеток и тканей практически всегда сопровождает процессы жизнедеятельности и может быть обусловлено тремя типами реакций: реакциями активных форм кислорода (АФК), реакциями перекисного окисления липидов, реакциями с участием оксида азота. Главным источником АФК в организме человека и животных служат клетки-фагоциты. К ним относятся нейтрофильные гранулоциты и агранулоциты моноциты. Изучение хемилюминесцентной активности двух типов этих клеток позволит понять особенности их функционирования в иммунной системе. Непосредственной причиной хемилюминесценции активированных фагоцитов считают образование синглетного кислорода в реакциях между кислородными радикалами, перекисью водорода и гипохлоритом.

Нейтрофилы являются преобладающей популяцией белых клеток крови. В крови человека содержится $2,0-7,5 \times 10^9/\text{л}$ нейтрофилов, что составляет 50-70% от общего числа лейкоцитов крови. Диаметр нейтрофилов составляет 9—12 мкм. Им свойственна уникальная морфология: ядро сегментированное (обычно состоит из 3 сегментов) с плотно упакованным хроматином (гетерохроматином); цитоплазма содержит нейтральные (по данным окрашивания) гранулы, что и определяет название этих клеток. Особенности хроматиновой структуры ядра (недоступность промоторных участков для дифференцировочных факторов) значительно ограничивает экспрессию генов и синтез макромолекул нейтрофилами *de novo*. Тем не менее, вопреки ранее существовавшим представлениям, нейтрофилы сохраняют способность к биосинтезу, хотя и в ограниченном масштабе. Срок их пребывания в циркуляции составляет 7-10 ч. затем нейтрофилы мигрируют в ткани где через 3-5 сут. пребывания подвергаются спонтанному апоптозу. Нейтрофилы являются единственными фагоцитами, которые помимо фагоцитоза способны и к внешнему киллингу, так как содержат NADPH - оксидазу, катализирующую синтез супероксид радикала – главного фактора бактерицидности фагоцитов.

Моноциты – долгоживущие и наиболее крупные клетки крови размером 9-15 мкм относящиеся группе агранулоцитов, с ядром бобовидной формы и тонкой структурой хроматина. Моноциты составляют от 3 до 11 % всех лейкоцитов, способны к амёбовидному движению, проявляют выраженную фагоцитарную и бактерицидную активность. Фагоцитарный индекс моноцитов примерно в 3 раза выше, чем у нейтрофилов.

Моноцит – наиболее активный фагоцит периферической крови. Моноциты появляются в очаге воспаления после нейтрофилов и проявляют максимум активности в кислой среде, в которой нейтрофилы теряют свою активность, и как правило не погибают после фагоцитирования (возможна гибель моноцитов при наличии у фагоцитированного материала каких-либо цитотоксических для моноцита свойств). Этим они отличаются от нейтрофилов и эозинофилов, способных поглощать лишь

относительно небольшие частицы и как правило погибающих после фагоцитирования.

Фагоцитируя микробов, погибших лейкоцитов, поврежденные клетки тканей, моноциты очищают место воспаления и подготавливают его для регенерации. Эти клетки образуют отграничивающий вал вокруг неразрушаемых инородных тел. Моноциты образуются в костном мозге.

После созревания в костном мозге, в кровь выходят не окончательно созревшие клетки, которые обладают высокой способностью к фагоцитозу. Длительность пребывания моноцитов в кровотоке составляет 2-4 суток, а затем они мигрируют в ткани где дифференцируются в разнообразные формы макрофагов и дендритные клетки и живут несколько лет.

Изучение хемилюминесцентной активности моноцитов крови позволит понять особенности их функционирования в кровеносном русле.

Цель исследования: сравнительное изучение особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов крови у практически здоровых людей.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись нейтрофильные гранулоциты и моноциты, выделенные от практически здоровых людей в возрасте от 20 до 50 лет. Моноциты выделяли из крови доноров следующим образом.

Клетки цельной гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина: $\rho=1,077$ г/см³ – для отделения моноклеарной фракции. Центрифугировали при 400g 40 мин. Снимали моноклеарную фракцию отмывали от фикола центрифугированием в PBS дважды при 400g. Отмытые клетки моноклеарной фракции подчитывали с трипановым синим определяя количество живых клеток. Исходя из этого разводили в среде 1640 с глутаматом до концентрации 5 млн./мл. заливали в чаши Петри и инкубировали в CO² инкубаторе в течении 1 часа. После чего сливали надосадочную жидкость вместе с лимфоцитами, прикрепившиеся клетки (моноциты), открепляли с помощью раствора Версена при инкубации 20 мин. в холодильнике при +4 °C. Отмывали с добавлением 200 мкл сыворотки и 1 мл среды 1640 при 400g 5 мин. Подчитывали количество живых клеток разводили до 1 млн./мл.

Для определения функциональной активности моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов периферической крови использовали хемилюминесцентный метод.

Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 20 мкл донорской сыворотки АВ(IV)Rh(-), 50 мкл люминола или люцигенина в концентрации 10⁻⁵ М, 40 мкл опсонизированного зимозана (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 200 мкл нейтрофилов в концентрации 1 млн/мл подсчитанных в лейкоцвесии и 240 мкл раствора Хэнкса для определения спонтанной хемилюминесценции или 200 мкл раствора Хэнкса. Суспензию опсонизированного зимозана готовили путем инкубации 2 мг зимозана с 1 мл донорской сыворотки АВ(IV)Rh(-) 30 минут при 37° C. После инкубации смесь осаждали и трижды отмывали центрифугированием в физиологическом растворе по 10 минут при 800 g. Полученный опсонизированный зимозан разводили в растворе Хэнкса без фенолового красного до концентрации 2 мг/мл. Оценку спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL3606” (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум, максимальное значение интенсивности, а также площадь под кривой хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной и определяли как индекс активации. Известно, что люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная активная форма кислорода

и синтезируется в системе НАДФН - оксидазы. Следовательно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы в этих клетках.

Результаты исследования и обсуждение. При исследовании хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов обнаружено, что площадь под хемилюминесцентной кривой в спонтанном люминол-зависимой хемилюминесценции ниже у моноцитов, чем у нейтрофилов и зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции также остается на низком уровне относительно нейтрофильных гранулоцитов. Время выхода на максимум спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции у моноцитов достоверно выше, чем у нейтрофильных гранулоцитов. Время выхода на максимум зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции также достоверно выше, чем у нейтрофилов. В то же время, индекс активации у моноцитов был выше более чем в 6 раз по сравнению с выявляемым у нейтрофильных гранулоцитов. При сравнении люцигенин-зависимых хемилюминесценции моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов наблюдали низкий уровень квантового выхода у моноцитов.

Так как люцигенин взаимодействует супероксид анионрадикалом $O_2^{\cdot -}$. Этот радикал образуется в реакция одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода НАДФН-оксидазным комплексом цитоплазматической мембраны или мембран эндоплазматического ретикулума, либо дыхательной цепью внутренней мембраны митохондрий. Следовательно на цитоплазматической мембране моноцитов слабо представлен НАДФН-оксидазный комплекс. У нейтрофильных гранулоцитов на поверхности цитоплазматической мембраны хорошо представлен НАДФН-оксидазный комплекс.

Заключение. Таким образом, моноциты в отличие от нейтрофильных гранулоцитов в состоянии относительного покоя менее хемилюминесцентно активны. При дополнительной индукции функциональной активности моноциты имеют более высокий уровень индекса активации, чем у нейтрофильных гранулоцитов.